



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 100 37 861 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:

A 61 K 31/7088

DE 100 37 861 A 1

- (21) Aktenzeichen: 100 37 861.7
(22) Anmeldetag: 1. 8. 2000
(43) Offenlegungstag: 14. 2. 2002

(71) Anmelder:

Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

(72) Erfinder:

Jürchott, Karsten, 15345 Altlandsberg, DE;
Bergmann, Stephan, 10245 Berlin, DE; Royer,
Hans-Dieter, Dr., 14195 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen

(57) Die Erfindung betrifft Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen. Diese Mittel senken die zelluläre Konzentration des Proteins Nucleolin, wodurch die Proliferation HPV-abhängiger Tumore gesenkt wird. Insbesondere werden die Mittel deshalb zur Therapie von HPV-abhängigen Tumoren (Cervixkarzinom etc.) eingesetzt. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird die Wirkung des Proteins Nucleolin mit einem Anti-Sense Oligonukleotid gegen die Nucleolin-mRNA gehemmt. Als Anti-Sense Oligonukleotid wird u. a. die Sequenz 5'-TCA CCA TGA TGG CGG CGG-3' eingesetzt.

DE 100 37 861 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen. Diese Mittel senken die zelluläre Konzentration des Proteins Nucleolin, wodurch die Proliferation HPV-abhängiger Tumore gesenkt wird. Insbesondere werden die Mittel deshalb zur Therapie von HPV-abhängigen Tumoren (Cervixkarzinom etc.) eingesetzt. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

[0002] In den letzten 20 Jahren wurden verschiedene Papilloma-Viren als Ursache von Krebskrankungen, insbesondere von Cervixkarzinomen, identifiziert (Harald zur Hausen, Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis, Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, No. 9, Mai 3, 2000). Von besonderer Bedeutung sind dabei die Typen 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58 und 69. Die DNA dieser Viren kann fast immer in Cervixkarzinomen nachgewiesen werden. Das Genom dieser Viren enthält zwei Oncogene, E6 und E7. Es konnte in Zellkultur- und Mausversuchen nachgewiesen werden, daß diese beiden Proteine zu einer Immortalisierung und zur Transformation der infizierten Zellen führt. Diese Prozesse sind eine grundlegende Voraussetzung für die spätere Tumorentstehung und -progression. Die von einem Cervixkarzinom abgeleiteten Zelllinien weisen eine E6 und E7 abhängige Proliferation auf. Die Expression dieser Oncogene wird von zellulären Proteinen (Transkriptionsfaktoren) gesteuert.

[0003] Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, entsprechende therapeutische Mittel bereitzustellen, die die Expression der Oncogene hemmen.

[0004] Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Sie basiert auf der eigenen Erkenntnis, daß das Protein Nucleolin (auch bekannt als C23) als Regulator der Expression von E6 und E7 dient. Nucleolin ist ein multifunktionelles Protein in proliferierenden Zellen, welches im Zellkern (im Nucleoplasma und in den Nucleoli), im Zytoplasma und in der Zellmembran nachgewiesen wurde. Es ist beteiligt an der Organisation der Chromatinstruktur, der Biogenese der Ribosomen und am Nucleo-Zytoplasmatischen Transport (Hervé Ginisty, Hélène Sicard, Benoit Roger and Philippe Bouvet, Structure and functions of nucleolin, Journal of Cell Science 112, 761–772 (1999)).

[0005] Es konnte nun gezeigt werden, daß das Protein Nucleolin spezifisch mit Bindungsstellen im Enhancer des HPV Typ 18 interagieren kann und dadurch die Expression von E6 und E7 stimuliert. Die Absenkung der zellulären Konzentration von Nucleolin durch Antisense-Oligonukleotide bzw. eine Anti-Sense-mRNA führte zur Hemmung der Proliferation von Zelllinien, die durch ein integriertes HPV-Genom charakterisiert sind. Die Proliferation von Zelllinien, die kein HPV-Genom enthielten, wurde im Gegensatz dazu nicht beeinflußt.

[0006] Gegenstand der Erfindung sind deshalb Mittel, die das Protein Nucleolin hemmen, wodurch sie für die Therapie maligner Erkrankungen, insbesondere von HPV-abhängigen Tumoren (Cervixkarzinom etc.) eingesetzt werden können. Erfindungsgemäß handelt es sich um Substanzen, die in der Lage sind, die zelluläre Konzentration von Nucleolin spezifisch zu senken. Erfindungsgemäße Substanzen sind Nukleotide, wie u. a. Anti-Sense-Oligonukleotide oder eine Anti-Sense-RNA sowie Ribozyme, die gegen die mRNA von Nucleolin gerichtet sind.

[0007] Die erfundungsgemäßen Mittel werden entweder direkt oder über einen gentherapeutischen Vektor, wie z. B. Adenovirusvektoren, eingesetzt. Zur direkte Anwendung liegen die Mittel, vorzugsweise in Formulierungen zur parenteralen Applikation oder in Form von liposomalen Kom-

plexen vor.

[0008] Die Vektoren zur gentherapeutischen Verwendung werden nach an sich bekannter Weise bereitgestellt. Dazu wird ein Anti-Sense-Oligonukleotid, die Anti-Sense-RNA oder ein entsprechendes Ribozym in einen gentherapeutischen Vektor (z. B. replikationsdefiziente Adenoviren) kloniert. Die rekombinanten Viren werden in Helferzellen (293-Zellen) vermehrt und anschließend mittels der üblichen Verfahren für den Einsatz in der Therapie vorbereitet.

[0009] Darüberhinaus können die Mittel in einer Ausführungsvariante der Erfindung mit bekannten Zytostatika (Doxorubicin, Adriablastin etc.) kombiniert werden.

[0010] In einer bevorzugten Ausführungsvariante handelt es sich um das

15 asOligo: 5'-TCA CCA TGA TGG CGG CGG-3' welches als therapeutisches Mittel Verwendung findet, wodurch eine Absenkung der zellulären Konzentration von Nucleolin, und damit eine mehr als 80%ige Hemmung der Proliferation von HPV-abhängigen Tumoren, erreicht wird.

[0011] Die Herstellung der pharmazeutischen Mittel erfolgt nach an sich bekannten technischen Herstellungsverfahren, in dem man die therapeutische Menge eines genetischen Materials mit an sich bekannten Hilfs- und Trägerstoffen kombiniert und in die gewünschte Formulierung 25 überführt.

Ausführungsbeispiele

Senkung der zellulären Nucleolin-Konzentration mittels 30 Antisense-Oligonukleotiden gegen die Nucleolin-mRNA

[0012] Zur Senkung wird folgendes Nucleolin Antisense-Oligo eingesetzt:

asOligo: 5'-TCA CCA TGA TGG CGG CGG-3'

[0013] Hela-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,5–10 M) dieses Oligonukleotids 48 Stunden inkubiert. Zur Erhöhung der Aufnahme der Oligonukleotide durch die Zellen wurden Liposomen verwendet. Nach der Inkubation wurde die Proliferation der Zellen mittels eines colorimetrischen ELISA's, basierend auf dem Einbau von BrdU in die neu synthetisierte zelluläre DNA, bestimmt. Es konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation der Hela-Zellen beobachtet werden, die bei der höchsten verwendeten Oligonukleotidkonzentration bei über 80% lag. Im Gegensatz dazu konnte bei der Verwendung eines unspezifischen Kontrolloligonukleotids keine Beeinflussung der Proliferation festgestellt werden. In parallel durchgeföhrten Versuchen mit Zelllinien, die kein HPV-Genom enthalten (z. B. HBL-100), konnte ebenfalls keine Hemmung der Poliferation beobachtet werden.

[0014] Darüberhinaus wurde erfolgreich ein Adenovirus mit der Nucleolin cDNA in antisense Orientierung für die Absenkung der intrazellulären Konzentration von Nucleolin verwendet.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Mittel zur Therapie maligner Erkrankungen enthaltend mindestens eine Substanz, welche die Wirkung des Proteins Nucleolin im Körper hemmt.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz, die die Wirkung des Proteins Nucleolin im Körper hemmt, ein Anti-Sense Oligonukleotid gegen die Nucleolin-mRNA ist.

3. Mittel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Anti-Sense Oligonukleotid die Sequenz 5'-TCA CCA TGA TGG CGG CGG-3' aufweist.

4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz, die die Wirkung des Proteins Nucleolin im Körper hemmt, eine Anti-Sense-RNA gegen die Nucleolin-mRNA ist.
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz, die die Wirkung des Proteins Nucleolin im Körper hemmt, ein Ribozym gegen die Nucleolin-mRNA ist.
6. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Substanz zur direkten Anwendung vorliegt, vorzugsweise in Formulierungen zur parenteralen Applikation oder in Form von liposomalen Komplexen.
7. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleotid in Form eines Vektors zur gentherapeutischen Anwendung vorliegt.
8. Mittel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Adenovirus-Vektor ist.
9. Mittel nach einem der Ansprüche 7 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Adenovirus, das die Anti-sense mRNA produziert, enthält.
10. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es Anti-Nucleolin-Antikörper enthält.
11. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich an sich bekannte Zytostatika wie Doxorubicin, Adriablastin u. a. enthält.
12. Verwendung der pharmazeutischen Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Therapie von HPV-abhängigen Tumoren, vorzugsweise von Cervixkarzinomen.
13. Oligonukleotid gekennzeichnet durch die Sequenz TCA CCA TGA TGG CGG CGG.
14. Verfahren zur Herstellung von einem pharmazeutischen Mittel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die therapeutische Menge eines Nukleotids mit an sich bekannten Hilfs- und Trägerstoffen nach an sich üblichen technischen Herstellungsverfahren kombiniert und in die gewünschte Formulierung überführt.

30

35

25

30

20

15

10

5

4

1

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -